

中药现代化技术

中草药用于酱油防腐初步研究

邵文尧^{1,2}, 陈旭¹, 刘正贵¹, 何宁¹, 王海涛¹, 李清彪^{1,2*}

(1. 厦门大学 化学化工学院 化学工程与生物工程系, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学 化学生物学福建省重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用滤纸片法研究了 118 种中草药对酱油腐败菌毕赤氏酵母的抑制情况, 考察了中草药的添加对酱油各项理化指标的影响, 并以苯甲酸钠为对照, 探讨其在酱油防腐效果方面的差异。结果表明, 乌梅、丁香及石榴皮对酱油的防腐效果优于苯甲酸钠, 并有助于改善酱油风味。其中, 乌梅的最低抑菌质量浓度 (MIC) 及最低杀菌质量浓度 (MBC) 均为最小, 分别达 31.0 g/L 和 62.5 g/L。

关键词: 中草药; 防腐; 酱油; 抑菌; 中药现代化技术

中图分类号: TS202.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214(2010)03-0241-04

Preliminary Studies on Application of Chinese Herbal Medicine in Soybean Sauce Preservation

SHAO Wen-yao^{1,2}, CHEN Xu¹, LIU Zheng-gui¹, HE Ning¹, WANG Hai-tao¹, LI Qing-biao^{1,2*}

(1. Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China; 2. Key Lab for Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract: The filter paper method was applied to study the inhibitory effect of 118 Chinese herbal medicines on *Pichia pastoris* which is the main spoilage microorganism in soybean sauce preservation. The influence of Chinese herbal medicine on the physico-chemical properties of soybean sauce was detected and the comparison to sodium benzoate, a widely applied food preservative, was conducted. The results showed that Wumei, Clove and Megranate pericarp improved the flavor of soybean sauce and presented a superior effect on soybean sauce preservation to sodium benzoate. The minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration of Wumei reached the lowest, being 31.0 g/L and 62.5 g/L, respectively.

Key words: medicinal plants; antiseptic; soybean sauce; bacteriostasis; modernization technology of traditional Chinese medicines

酱油是我国传统调味品, 优质酿造酱油味道鲜美、营养丰富^[1]。但酱油在贮存销售中易受微生物污染产生变霉、变味、变质^[2]。主要污染微生物毕赤氏酵母细胞为椭圆形、长椭圆形或腊肠形, 单个或成短链, 异形接合形成子囊孢子, 子囊孢子椭圆形^[3]。在麦芽汁琼脂上菌落为乳白色, 无光泽, 边缘有细缺口。在麦芽汁中培养, 培养液表面有白而皱的粗糙的菌

璞, 底内有菌体沉淀。此菌常使酒类和酱油产生白花, 形成浮膜, 为酿造工业中的有害菌^[4]。

目前酱油贮存销售过程中的防腐采用先灭菌后添加防腐剂的方法。此方法中的高温灭菌容易使酱油产生严重的焦糊味, 成品氨基酸态氮降低, 总酸上升和色泽加深等弊病, 严重影响了高品质酱油的生

收稿日期: 2009-10-15; 定用日期: 2009-12-07

作者简介: 邵文尧 (1980-), 男, 福建厦门人, 工程师, 在职硕士研究生, 师从李清彪教授, 从事生物化工研究, 电话: 0592-2184133, E-mail: wyshao@xmu.edu.cn。

联系人: 李清彪 (1963-), 男, 教授, 博士生导师, 电话: 0592-2189595, E-mail: kelqb@xmu.edu.cn。

产^[5-6]。目前,酱油中添加的防腐剂大多为化学药品,如苯甲酸钠、山梨酸钾及亚硫酸盐和亚硝酸盐等;与这些防腐剂相比,中草药大多具有显著的抗菌效果,副作用少,无残留,无耐药性等优点^[7-11],但其用于酱油防腐的研究鲜见报道。

本文就中草药用于酱油防腐进行探讨,研究了多种典型中草药提取物用于酱油防腐问题,以期改进传统酱油防腐方法,克服传统酱油防腐方法的缺点,在保证酱油品质和食用安全的基础上,简化生产工艺,降低生产成本。

1 实验部分

1.1 材料

石榴皮、地榆及乌梅等 118 种中草药 (购于厦门九鼎药房);菌种:毕赤氏酵母 (*Pichia*) (本课题组保存);酵母膏胨葡萄糖 (YPD) 培养基: w (酵母粉) = 2%, w (蛋白胨) = 1%, w (葡萄糖) = 2%, w (去离子水) = 95%。其他试剂均为 AR,由国药集团化学试剂有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 中草药水提液的制备

称取干燥中草药果肉或根茎枝节 50 g,粉碎,加蒸馏水 300 mL,微波 60 s (功率 1 000 W),超声波处理 30 min (功率 500 W),离心取上清液,旋转蒸发回流浓缩提取至 50 mL (相当于每 mL 中含 1 g 原生药的可提物),灭菌待用。将待用的 1 g/mL 原生药水提液添加到相应基础培养基,使其质量浓度达到各实验组所需。以此培养基作为各实验组培养基,不加水提液者为对照组培养基。

1.2.2 抑菌圈的测定

培养毕赤氏酵母至对数期 (16 ~ 18 h),取 200 μ L 菌悬液到 YPD 琼脂平板,涂布均匀。无菌操作将 7 mm 滤纸片贴至相应的区域,每片含原生药水提液 20 μ L,另取无菌水滤纸片作阴性对照,以两性霉素滤纸片作阳性对照,28 $^{\circ}$ C 培养箱培养 18 ~ 24 h,观察结果。用游标卡尺测量抑菌圈的直径,实验重复 3 次取算术平均值。

1.2.3 中草药粗提物及苯甲酸钠 MIC 及 MBC 的测定

配 30 只含有 1 mL 培养基的试管,将其标号为纯培养基,空白样,1[#],2[#],3[#],4[#],5[#],6[#],7[#],8[#],共 10 组,每组 3 个平行样。纯培养基不加任何物质,作为参比。向 1[#]试管内分别加入 0.5 g 中药提取物或苯甲酸钠,2[#]加入 0.25 g 中药提取物或苯甲酸钠,向其他 6 管顺序 2 倍递减加入提取物或苯甲酸钠。然后向 1[#] ~ 8[#],及空白样中加入 50 g/L 毕赤氏酵母菌悬液 (细胞浓度为 1 000 000 CFU/mL)。以水为参

比,测其在 30 h 初始和结尾两个点的 OD (600 nm) 值,以此判断其抑制效果,求得最小抑菌质量浓度 (此质量浓度下两点 OD 值未发生明显变化)。所有操作均在无菌条件下进行。

求得 MIC 后,将提取物质量浓度大于等于 MIC 的试管内的液体提取 100 μ L 涂在平板上,长时间放置,观察是否有菌落。没有菌落生长的平板所对应的提取物的质量浓度即为 MBC。

1.2.4 酱油的理化指标分析

依据酱油生产行业标准,选取了颜色变化、风味、pH、氨基氮含量为待测指标。感观检查:取 2 mL 试样于 25 mL 具塞比色皿中,加水至刻度,振摇观察色泽、澄明度,应不浑浊,无沉淀物。取 30 mL 试样于 50 mL 烧杯中,观察应无霉味,无霉花浮膜。用玻璃棒搅拌烧杯中试样后,尝其味不得有酸、苦、涩等异味。氨基酸态氮测定:甲醛值法 (GB/T 5009.39—2003)。

1.2.5 酱油的防腐效果测定

准备离心管若干,每个离心管取 1 mL 酱油,然后标号,从 0[#]标到 7[#],其中 0[#]为空白酱油,从 1[#]开始往里面添加量为最小 MIC 的天然产物提取物,天然产物提取物分别为乌梅、丁香、石榴皮、大黄、麻黄、女贞子,7[#]加苯甲酸钠。实验共 9 组平行样。对其中的 3 组进行巴氏消毒,3 组进行 121 $^{\circ}$ C 灭菌,剩余的 3 组未经过任何消毒,封装好后放 28 $^{\circ}$ C 培养箱内培养 18 h。准备马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 平板,将培养 18 h 后的酱油平板涂布,观察有无菌落生成。

2 结果与讨论

2.1 滤纸片法筛选中草药

由表 1 可知,石榴皮、乌梅、麻黄、大黄、丁香、女贞子、地榆、木瓜、覆盆子、大蓟、紫苏、黄连、紫草、葛根等 14 种中草药对毕赤氏酵母有较显著的抑制作用。

2.2 6 种中草药对毕赤氏酵母的 MIC 及 MBC

由表 2 可以看出,乌梅的 MIC 及 MBC 最低,分别为 31.0 和 62.5 g/L,苯甲酸钠的 MIC 及 MBC 超过国标规定最大添加量 1.0 g/L。

2.3 6 种中草药对酱油理化指标的影响

由表 3 可知,丁香和石榴皮赋予酱油特殊香气,添加中草药后的酱油营养成分氨基氮含量明显升高,添加苯甲酸钠后的酱油氨基氮含量略有降低。

2.4 6 种中草药对酱油的防腐效果

由表 4 可知,生酱油经传统巴氏消毒后,杂菌被有效地杀灭;添加天然产物后的生酱油,杂菌也被有效地杀灭;既添加中草药又巴氏消毒的生酱油杂菌可完全去除。乌梅、丁香、石榴皮防腐效果强于苯甲酸钠。

表 1 118种中草药对毕赤氏酵母的抑菌情况
Table 1 Inhibitory effect of 118 Chinese herbal medicines on *Pichia pastoris*

序号	天然产物提取物	抑菌圈直径 /mm	序号	天然产物提取物	抑菌圈直径 /mm	序号	天然产物提取物	抑菌圈直径 /mm
1	白芍	—	41	旱莲草	—	81	生地黄	—
2	五味子	—	42	蒲黄	—	82	垂盆草	—
3	连翘	—	43	旋覆花	—	83	土茯苓	—
4	丹参	—	44	潘泻叶	—	84	野菊花	—
5	泽兰	—	45	百合	—	85	秦皮	—
6	车前子	—	46	仙茅	—	86	青蒿	—
7	肉苁蓉	—	47	枳壳	—	87	薏苡仁	—
8	杜仲叶	—	48	白前	—	88	桑叶	—
9	败酱草	—	49	龙胆草	—	89	地骨皮	—
10	益母草	—	50	紫菀	—	90	枸杞	—
11	川芎	—	51	高良姜	—	91	忍冬藤	—
12	乌梅	+++	52	大青叶	—	92	白薇	—
13	麻黄	++	53	红花	—	93	射干	—
14	山茱萸	—	54	甘草	—	94	天花粉	—
15	女贞子	++	55	仙鹤草	—	95	马齿苋	—
16	大黄	++	56	淫羊藿	—	96	浙贝	—
17	木瓜	++	57	皂荚	—	97	白头翁	—
18	覆盆子	++	58	石韦	—	98	青黛	—
19	丁香	++	59	桔梗	—	99	川乌	—
20	龙葵	—	60	决明子	—	100	牛蒡子	—
21	厚朴	—	61	金银花	—	101	密蒙花	—
22	延胡索	—	62	板蓝根	—	102	胖大海	—
23	附子	—	63	槐花米	—	103	黄连	++
24	秦艽	—	64	大蓟	+	104	鬼针草	—
25	半边莲	—	65	蓝草	—	105	益智仁	—
26	灵芝	—	66	紫草	+	106	海螵蛸	—
27	百部	—	67	积雪草	—	107	郁李仁	—
28	苦参	—	68	田基黄	—	108	石榴皮	++
29	黄柏	—	69	银柴胡	—	109	紫苏	+
30	陈皮	—	70	蔓荆子	—	110	细辛	—
31	防己	—	71	红藤	—	111	防风	—
32	石斛碱	—	72	火麻仁	—	112	葛根	+
33	钩藤	—	73	赤芍	—	113	柴胡	—
34	槟榔	—	74	青箱子	—	114	桂枝	—
35	续断	—	75	牡丹皮	—	115	薄荷	—
36	大腹皮	—	76	胡黄连	—	116	羌活	—
37	夏枯草	—	77	淡竹叶	—	117	荆芥	—
38	木香	—	78	仙草	—	118	地榆	++
39	化橘红	—	79	半枝莲	—			
40	升麻	—	80	贯众	—			

注:抑菌圈直径:+++为 21~30 mm; ++为 16~20 mm; +为 9~15 mm; -为 <9 mm。提取物添加量 20 μL。

表 2 6种中草药的 MIC及 MBC

Table 2 MIC and MBC of 6 Chinese herbal medicines		
中药提取物	MIC质量浓度 /(g/L)	MBC质量浓度 /(g/L)
乌梅	31. 0	62. 5
丁香	31. 0	125. 0
麻黄	125. 0	500. 0
石榴皮	62. 5	125. 0
女贞子	62. 5	62. 5
大黄	62. 5	125. 0
苯甲酸钠	2. 0	4. 0

表 3 6种中草药对酱油理化指标的影响

Table 3 Influences of 6 Chinese herbal medicines on the physico-chemical index of soybean sauce				
样品	颜色变化	风味	起始 pH	氨基氮含量 (g/100 mL)
水	—	无味	—	—
酱油	黄褐色	原味	5. 43	0. 630
酱油 +乌梅	颜色加深	略酸	4. 95	0. 679
酱油 +大黄	颜色加深	苦	5. 39	0. 665
酱油 +麻黄	颜色加深	略苦	5. 36	0. 707
酱油 +丁香	颜色加深	特殊香味	5. 40	0. 700
酱油 +石榴皮	颜色加深	特殊香味	5. 25	0. 756
酱油 +女贞子	颜色加深	略苦	5. 35	0. 707
酱油 +苯甲酸钠	未变化	原味	5. 43	0. 628

(下转第 279页)

粉紧密的颗粒表面及结晶结构,产生晶格缺陷,结晶度下降,分子发生降解,削弱了氢键结合力,激活了活性基团,反应活点增多,同时也减弱了反应试剂的内扩散阻力,氧化剂能顺利渗透到淀粉团粒内部参与反应。

(2)活化 60 min 的淀粉在反应时间 90 min 反应温度 30 ℃、 $n(\text{NaD}_4)/n(\text{AGU})=0.8$ 、 NaD_4 浓度 0.5 mol/L、体系 pH=4 的条件下制得的双醛淀粉 $x(\text{醛基})=95.4\%$,而在相同条件下,由原本薯淀粉制得的双醛淀粉 $x(\text{醛基})$ 仅为 58.2%。

(3)机械活化从内部强化淀粉,提高了淀粉的氧化反应活性,改变了淀粉的颗粒形貌及晶体结构,这必然对其产物的理化性质产生影响,结果有待本课题组后续研究。

参考文献:

[1] 沈 斌,魏荣卿,刘晓宁,等. 采用低温工艺制备双醛淀粉 [J]. 食品与发酵工业, 2004, 30 (8): 1 - 5.

[2] 刘 锋,孙光洁,申守清,等. 间接电合成法制取双醛淀粉 [J]. 精细化工, 2000, 17 (2): 72 - 73.

[3] 李宏利,李德富,伍 瑞,等. 双醛淀粉制备工艺的优化研究 [J]. 中国皮革, 2007, 36 (13): 48 - 51.

[4] 刘 永,周家华. 正交优化制备双醛淀粉的研究 [J]. 粮油加工

与食品机械, 2005 (1): 83 - 85.

[5] Guan J J, Hanna M A. Functional properties of extruded foam composites of starch acetate and com cobfiber [J]. Industrial Crops and Products, 2004, 19 (3): 255 - 269.

[6] 何学军,沈 斌,刘晓宁. 双醛淀粉的制备与应用 [J]. 生物加工过程, 2004, 2 (3): 1 - 4.

[7] Boldyrev V V. Mechanical activation of solid and its application to technology [J]. Journal of Chemical Physics, 1986, 83 (11/12): 821 - 829.

[8] 黄祖强,胡华宇,童张法,等. 玉米淀粉的机械活化效果分析 [J]. 化学工程, 2006, 34 (10): 51 - 54.

[9] 黄祖强,陈 渊,钱维金,等. 机械活化对玉米淀粉结晶结构与化学反应活性的影 [J]. 化工学报, 2007, 58 (5): 1307 - 1313.

[10] 谭义秋,钱维金,黄祖强,等. 机械活化玉米淀粉与丙烯酸胺接枝共聚反应的研究 [J]. 食品与机械, 2007, 23 (5): 37 - 40.

[11] 谭义秋,黄祖强,王茂林,等. 机械活化木薯淀粉干法制备氧化淀粉的研究 [J]. 食品科技, 2008 (6): 32 - 36.

[12] 谭义秋,赵汉民,农克良,等. 机械活化木薯淀粉干法制备羧甲基淀粉的研究 [J]. 粮食与饲料工业, 2009 (9): 20 - 23.

[13] 张继武,朱友益,张 强,等. 玉米淀粉制备双醛淀粉的试验 [J]. 农业工程学报, 2002, 18 (3): 135 - 138.

[14] 黄祖强,陈 渊,钱维金,等. 机械活化对木薯淀粉醋酸酯化反应的强化作用 [J]. 过程工程学报, 2007, 7 (3): 501 - 505.

[15] 黄祖强,胡华宇,童张法,等. 机械活化对木薯淀粉糊透明度的影响 [J]. 过程工程学报, 2006, 6 (3): 427 - 430.

(上接第 243 页)

表 4 6 种中草药对酱油的防腐效果
Table 4 Antiseptic effect of 6 Chinese herbal medicines on soybean sauce

名称	未巴氏消毒	巴氏消毒
生酱油	—	++
酱油+乌梅	++	+++
酱油+丁香	++	+++
酱油+石榴皮	++	+++
酱油+麻黄	+	++
酱油+大黄	+	++
酱油+女贞子	+	++
酱油+苯甲酸钠	+	++

注: +++表示菌落总数 <1; ++表示菌落总数 1~5; +表示菌落总数 5~10; —表示菌落总数 >10。

3 结论

乌梅、丁香及石榴皮等中草药对酱油腐败菌毕赤氏酵母具有较强抑制作用。在选用的 118 种中草药中,乌梅的最低抑菌质量浓度 MIC (31.0 g/L) 及最低杀菌质量浓度 MBC (62.5 g/L) 最小;对照样苯甲酸钠的 MIC 及 MBC 超过国标规定最大添加量 1.0 g/L。丁香和石榴皮赋予酱油特殊香气,添加后的酱油营养成分氨基氮含量明显升高,添加苯甲酸钠后的酱油氨基氮含量略有降低。生酱油添加乌梅、丁香和石榴皮后的防腐效果与传统防腐效果相当;既添加乌梅、丁香和石榴皮又巴氏消毒的生酱油

杂菌可完全去除。乌梅、丁香、石榴皮防腐效果强于苯甲酸钠。

综上所述,乌梅、丁香及石榴皮不仅能有效抑制甚至杀灭酱油腐败菌毕赤氏酵母,还有助于提高酱油风味,在酱油防腐工业上应用前景广阔。

参考文献:

[1] 陈驹声. 酱油及酱类的酿造 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1990.

[2] 刘平安. 酱油制曲过程中常见杂菌污染及防治措施 [J]. 中国调味品, 2001, 8 (8): 23 - 24.

[3] 周德庆. 微生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.

[4] 郝常明,赵建锋,黄雪菊. 生物发酵染菌问题的探讨 [J]. 医药工厂设计, 2007, 28 (2): 11 - 5.

[5] 汪世华,彭利民,周林峰,等. 发酵工业染菌分析及其防止 [J]. 发酵科技通讯, 2002, 31 (4): 19 - 20.

[6] 巩传友,孙 岩. 如何确保酱油种曲质量 [J]. 中国酿造, 2005 (7): 43 - 44.

[7] 周立刚. 植物抗菌化合物 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2005.

[8] Cowan M M. Plant products as antimicrobial agents [J]. Clinical Microbiology Reviews, 1999, 12 (4): 564 - 582.

[9] Cushnie T P T, Lamb A J. Antimicrobial activity of flavonoids [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2005, 26: 343 - 356.

[10] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 94: 223 - 253.

[11] 张前军,杨小生,郝小江. 我国天然抗菌药物研究进展 [J]. 草药, 2008, 39 (2): 304 - 307.